

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/00822

VERIFICATION OF A TRANSLATION

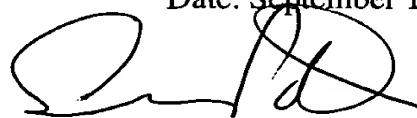
I, Susan POTTS BA ACIS

Director to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way, Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare:

That the translator responsible for the attached translation is knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of RWS Group plc knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR00/00822 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: September 10, 2001



Signature of Director :

For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

1005 8 5 432 0791739 b'ceh 8130

THIS PAGE BLANK (USPTO)



EJU

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 08 MAY 2000

WIPO

PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 AVR. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA REGLE
17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **31.MAR1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 04032 -**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **31 MARS 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ demande initiale

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

237605 D18047 FA

01 45 00 92 02

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐

oui

☐

non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Bioprécurseurs aptes à libérer un dérivé rétinolique par mise à profit de l'activité
enzymatique de la surface cutanée et compositions pharmaceutiques et/ou cosmétiques**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

PIERRE FABRE Dermo-COSMETIQUE

Forme juridique

SOCIÉTÉ ANONYME

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐

oui

☒

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐

requis pour la 1ère fois

☐

requis antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PREPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

92-1001

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 04032

TITRE DE L'INVENTION :

Bioprécurseurs aptes à libérer un dérivé rétinolique par
mise à profit de l'activité enzymatique de la surface cutanée et compositions
pharmaceutiques et/ou cosmétiques

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

REDOULES Daniel
9, rue Adolphe Coll
31300 Toulouse, FR

TARROUX Roger
36, boulevard Koenigs
31300 Toulouse, FR

FOURNIER Didier
3, rue Raymond Poincaré
31320 Castanet Tolosan, FR

PERIE Jean-Jacques
3, Chemin du Catilat
Vigoulet-Auzil
313230 Castanet, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance)
lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

18 mai 1999

CABINET REGIMBEAU

921253

La présente invention se rapporte à une composition cosmétique ou pharmaceutique pour application cutanée, contenant un composé apte à libérer deux substances actives par action de deux activités enzymatiques, les activités glucocérébrosidase et estérase, ceci à partir d'un gluco-conjugué.

Il a été vérifié après sur-expression de la β -Glucocérébrosidase cutanée que cette enzyme était bien capable de reconnaître et d'hydrolyser de tels gluco-conjugués permettant ainsi un relargage lent de la substance active, sans effet d'accumulation.

La stratégie des bio-précurseurs a été précédemment utilisée pour la libération d'actifs dans deux cas précédents :

- libération de rétinol à partir de son ester avec l'acide palmitique sous l'action de l'activité estérase de la peau (J. Boenlein, et al. Characterization of esterase and alcohol dehydrogenase activity in skin. Metabolism of retinyl palmitate to retinol (Vitamin A) during percutaneous absorption. Pharm. Res. 11, 1155- 1159 (1994)).

- libération de vitamine C à partir d'un gluco-conjugué sous l'action dans ce cas d'une activité glucosidase (brevet FR-2 715 565).

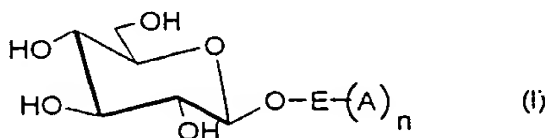
Les dérivés rétinoïques sont aujourd'hui utilisés en dermatologie dans différentes indications comme le psoriasis ou ichtyose, ou bien pour obtenir une dépigmentation de la peau (réduction de la mélanogénèse sous l'action de la vitamine A) ; des applications

contre le vieillissement de la peau sont également recherchées.

Cependant l'utilisation des dérivés rétinoïques par voie topique se heurte à un certain nombre de difficultés, du fait du manque de stabilité dans le temps et à la lumière de ces dérivés, de l'irritation résultant de sur-concentrations locales ainsi que d'une faible pénétration de ces dérivés au travers de la couche cornée. Ce dernier inconvénient est dû à la grande lipophilie de la substance qui déposée sur la peau est en fait en grande partie éliminée avec la desquamation. Par ailleurs, les effets secondaires (apparition de rougeurs, irritation, oedème et desquamation excessive) en limitent l'utilisation à des patients réellement motivés, tels ceux affectés d'une acné opiniâtre.

D'où l'intérêt de la présente invention d'amélioration de la bio-disponibilité de l'actif sous forme d'un complexe ternaire glucose-espaceur-actif, à pénétration facilitée et donc utilisable en faible quantité, évitant ainsi les effets néfastes de sur-concentrations locales, responsables des intolérances.

La présente invention concerne un complexe glucosylé ternaire, bioprécurseur d'au moins un principe actif rétinoïque, en particulier l'acide rétinoïque, destiné à une application percutanée, de formule (I)



dans laquelle :

- E représente un groupement espaceur hydrocarboné linéaire, ramifié ou cyclisé, de caractère aliphatique ou aromatique pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatome(s) d'oxygène et pouvant porter un ou plusieurs groupe(s) carbonyle,
- A représente un reste d'une molécule dudit principe actif rétinolique, lié au groupement espaceur par une fonction carboxylate,
- $n = 1$ ou 2 .

10

Selon une autre caractéristique de l'invention, dans le complexe de formule I, le groupement E représente un groupement doté d'une activité pharmaceutique et/ou cosmétique complémentaire, en particulier d'une activité d'hydratation, de

15 dépigmentation, et/ou d'une activité antibactérienne.

En particulier, le groupement E peut représenter un groupement dérivé du glycérol L ou D, de l'hydroquinone, ou de flavonoïdes, en particulier de

20 flavonoïdes d'origine naturelle.

A titre d'exemple particulier de complexe glucosylé selon l'invention, on mentionnera :

- le para-rétinoyl-phényl-glucopyranoside,
- le dirétinoyl-1,2-propanyl-glucopyranoside,
- 25 - le rétinoate de daidzine, et
- le rétinoate de génistine.

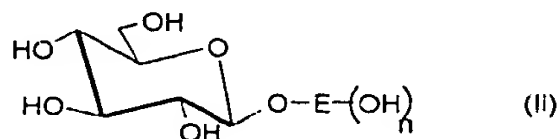
La présente invention s'étend également à des compositions pharmaceutiques ou cosmétiques à usage

30 topique, contenant un complexe glucosylé tel que défini précédemment, associé à un véhicule approprié pour l'administration percutanée.

Conformément à la présente invention, lorsque ladite composition est appliquée sur la peau, le complexe subit une double hydrolyse enzymatique, d'abord de type β -glucocérébrosidease conduisant à l'hydrolyse entre le glucose et le groupement espaceur, puis de type estérase conduisant à l'hydrolyse entre le groupement espaceur et le principe actif, ce dernier étant ainsi libéré de façon retardée sans effet d'accumulation dans les différentes couches de la peau.

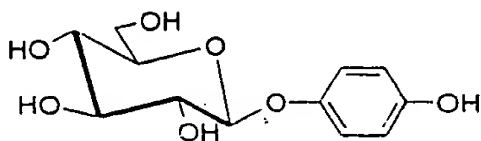
Avantageusement, la composition selon l'invention contient de 0,001 à 10% en poids, de préférence de 0,01 à 0,1% en poids de complexe glucosylé par rapport au poids total de la composition.

La présente invention s'étend également à un procédé pour la préparation des complexes glucosylés précédemment définis, qui se caractérise en ce que l'on fait réagir un composé de formule II

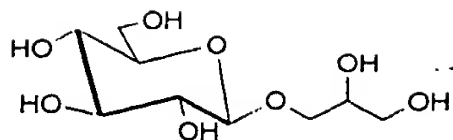


avec le principe actif sous forme de chlorure d'acide.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le composé de formule II répond à la formule plus précise IIa suivante



Selon une autre caractéristique, le procédé de formule II répondant à la formule IIb suivante



Enfin selon une dernière caractéristique de l'invention, le procédé implique la réaction entre les composés de formule II, IIa ou IIb avec le chlorure de rétinoyle.

Le complexe glucose-espaceur-actif, après rapide migration dans les premières couches de l'épiderme du fait de son caractère d'amphiphile est reconnu en tant que pseudo-substrat par les deux activités enzymatiques impliqués : β -glucocérébosidase (EC 3.2.1.45) responsable de l'hydrolyse entre glucose et espaceur, puis esterase responsable de la seconde hydrolyse entre espaceur et actif. Bien entendu l'espaceur peut lui même être choisi en tant qu'actif : ceci est réalisé ici en utilisant l'hydroquinone comme espaceur, lui même actif en tant que dépigmentant, ou antibactérien. Deux effets conjugués sont ainsi obtenus à partir d'une formulation unique.

Il a été démontré que les gluco-conjugués décrits dans l'invention permettent une réelle stabilisation des actifs rétinoïques ainsi qu'une très bonne pénétration : alors que des dérivés trop lipophiles comme l'acide rétinoïque ou la vitamine E (α -tocophérol) s'accumulent dans les couches supérieures du stratum cornéum après application topique et sont éliminés par desquamation, leurs gluco-conjugués au contraire inclus dans un même excipient, sont retrouvés pour partie (partie non encore hydrolysée) au sein des couches supérieures et aussi inférieures du stratum

cornéum, et ceci plusieurs jours après leur application.

La conception de ces gluco-conjugués en tant que pseudo-substrats dirigés vers l'activité β -
 5 Glucocérébrosidase pour la première hydrolyse est justifiée par plusieurs facteurs :

- cette enzyme est accessible depuis la surface cutanée comme cela a été montré par application topique d'un inhibiteur spécifique (W. M ; Holleran, P. M
 10 Elias. J. Lipid. Res. 1994, 35. 905) ;

- cette activité enzymatique prépondérante dans la formation des lipides de la surface cutanée (40% des lipides résultent de cette activité) est bien conservée d'une part entre sujets et d'autre part au cours du
 15 cycle des saisons ;

- dans les conditions utilisées dans la présente invention, cette activité est suffisante, puisque supérieure à l'activité estérase (exemple 1).

20 Cette enzyme a donc été sur-exprimée ; cela a permis de déterminer les paramètres cinétiques des substrats par rapport à une référence. Des valeurs sont données à titre d'exemple pour 2 conjugués, l'un à 2 l'autre à 3 composants. Les valeurs indiquent que ces
 25 pseudo-substrats sont mieux reconnus que le substrat de référence (valeurs des K_m), ce qui s'explique par le caractère plus lipophile de ces conjugués par rapport à la référence 4-methylumbelliferyl-glucopyranoside vis à vis d'une enzyme dont le substrat est lui même très
 30 lipophile (β -glucosyl-ceramide) ; d'autre part les valeurs V_m , montrent que les actifs sont bien relargués et ceci avec des cinétiques compatibles avec l'objectif visé, à savoir un effet dans le temps à partir d'un

pseudo-substrat appliqué sur la peau en quantité minimale mais qui sera intégralement utilisée.

La stratégie présentée précédemment peut être étendue et modifiée dans différentes directions. A
5 titre d'exemples :

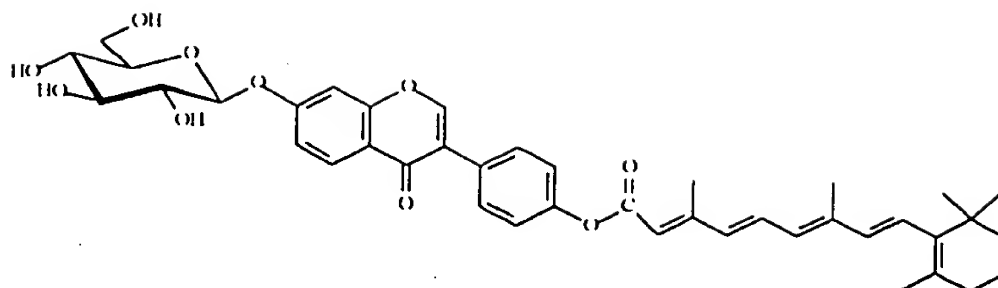
- modification de l'espaceur :

Celui-ci peut être modifié en une structure plus proche de celle du substrat naturel (β -
Glucocérébroside) dans lequel l'espaceur est apparenté
10 au glycérol. Le glucoconjugué correspondant glucose-
glycérol (L ou D) - acide rétinoïque a également été
synthétisé et étudié. Notons que les deux groupements
hydroxyle libres sur le glycérol permettent de fixer
sous forme d'ester deux unités rétinoïques par molécule
15 de complexe. Dans ce cas de figure, l'action
complémentaire à l'activité rétinoïque est celle d'un
effet hydratant apporté par la libération in situ du
glycerol ;

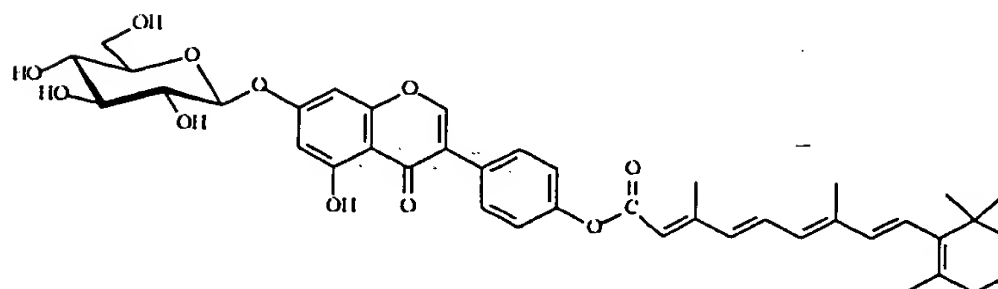
20 *- association à l'activité rétinoïque de propriétés
anti-oxydantes de flavonoïdes :*

Un certain nombre de flavonoïdes d'origine naturelle sont associés à une partie saccharidique qui leur confère des propriétés d'amphiphiles.

25 C'est par exemple le cas des génistines ou de la daidzine. L'absorption de tels composés par la surface cutanée est donc assurée. A cette première activité d'anti-oxydant, est associée l'activité rétinoïque par fixation d'une ou plusieurs molécules d'acide
30 rétinoïque par unité flavone. Les structures correspondantes sont présentées ci-après :



Rétinoate de daidzine



Rétinoate de genistine

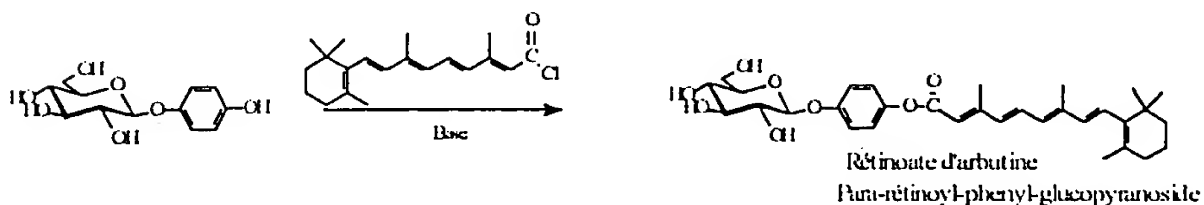
En conclusion, la présente invention montre le parti qu'il peut être pris des activités β -
 5 Glucocérébroside et esterase de la surface cutanée pour obtenir la libération de différents types d'actifs à partir de bio-précurseurs glucosylés.

La structure des gluco-conjugués correspondants assure, une bonne pénétration en raison de leur
 10 caractère d'amphiphile et donc une utilisation optimale, une très bonne reconnaissance par la première enzyme β -glucocérébroside du fait de la présence d'un ou plusieurs résidus rétinyl lipophiles et une libération des actifs avec une cinétique assurant une
 15 coupure effective et un effet avec rémanence dans le temps.

Les synthèses des gluco-conjugués, leur formulation ainsi que leur activité en tant que pseudo-substrats sont décrits ci-dessous :

a) Synthèse des bioprécurseurs

- 5 Le rétinoate d'arbutine (p-rétinoyl-phényl-glucopyranoside) est préparé à partir de l'arbutine et du chlorure de rétinoyl selon le schéma réactionnel suivant.

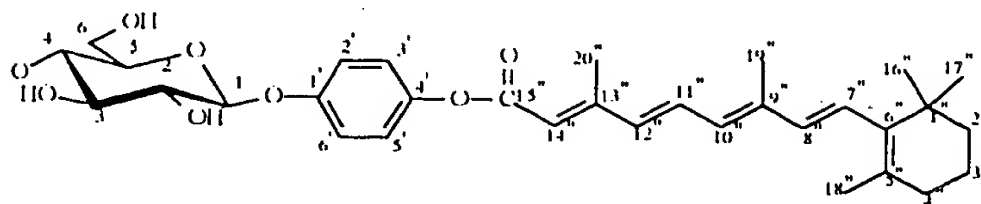


- Cette réaction de couplage résulte d'une
10 déshydrogénation sélective et initiale de la fonction phénol suivie d'une attaque nucléophile du phénoxy formé sur le chlorure d'acide. La déshydrogénation sélective est obtenue par l'addition, au maximum, d'un équivalent de base (généralement 0.9 équivalent)
15 réagissant sur le groupement phénol ($pK_a=9$) de pK_a bien plus faible que les autres fonctions hydroxyle de la partie glucose ($pK_a > 16$).

Préparation du chlorure de rétinoyl

- A une suspension de 1g (3.32 mmol) d'acide
20 rétinoïque dans 15 ml de chlorure de méthylène anhydre refroidie à 0°C , maintenue sous argon et contenant 0.32g de pyridine (0.4 mmol), on ajoute, goutte à goutte, 0.41 g (3.3 mmol) de chlorure de thionyle dans le chlorure de méthylène (2 ml). On laisse revenir à
25 température ambiante et on poursuit l'agitation pendant 1 heure. On filtre sur laine de verre le sirop rouge obtenu qui est immédiatement utilisé dans l'étape suivante.

Préparation du rétinolate d'arbutine (p-rétinoyl-phényl-glucopyranoside)



A une suspension de 50 mg (2.1 mmol) d'hydrure
 5 de sodium dans 10 ml de DMF anhydre refroidie à 0°C et
 maintenue sous argon, on additionne, goutte à goutte,
 0.7 g (2.6 mmol) d'arbutine. On ajoute lentement les 15
 ml de la solution de chlorure de rétinoyl préparés
 précédemment et on agite le mélange pendant 1 heure en
 10 laissant revenir à température ambiante. On hydrolyse
 l'excès de chlorure d'acide par 5 ml d'eau et on
 neutralise par ajout de quelques gouttes d'une solution
 saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. La phase
 organique extraite, séchée et évaporée sous vide est
 15 purifiée par HPLC (C18 : MeOH-H₂O : 85-15).

On obtient 1.1 g de cristaux rouges. Rd= 73 %.

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm :

20 6.9-7.1 (m, 5H, H-2', 3', 5', 6', 11"), 6.1-6.35
 (m, 4H, H-7", 8" -CH=CH, 10", 12" -CH=CH), 5.88 (s, 1H,
 H-14" -CH=CH-), 4.84 (d, 1H, H-1), 3.3-3.9 (m, 6H, H-2,
 3, 4, 2 H6), 2.3 (1 s, 3H, H-20" -CH₃), 1.97-2.03 (1s
 et m, 5H, H-19" -CH₃, 4" -CH₃), 1.36-1.68 (1m, 1s, 7H,
 25 H-2", 3" -(CH₂)₂, 18" -CH₃), 1.02 (1s, 6H, H-16", 17" -
 CMe₂).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm :

166 (C-15"), 155.5 (C-13"), 154.7 (C-1'), 145.6
 30 (C-4'), 140.2 (C-9"), 137.7 (C-6"), 137.4 (C-8"), 135.1

(C-12"), 131.9 (C-11"), 130 (C-5"), 129.7 et 128.9 (C-10", 7"), 122.8 (C-3', 5'), 117.8 (C-14"), 117.4 (C-2', 6'), 100.1 (C-1), 75.7 (C-3), 75 (C-5), 71.5 (C-2), 70.1 (C-4), 61.7 (C-6), 39.6 (C-2"), 34.3 (C-1"), 33.2 (C-4"), 29 (C-16", 17"), 21.8 (C-18"), 19.3 (C-3"), 14.1 et 13 (C-20", 19")

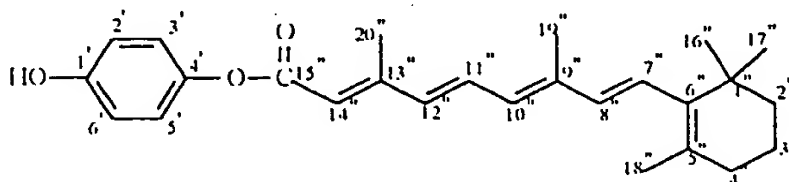
IR : 3418 cm^{-1} OH, 1700 cm^{-1} (ester C=O), 1684, 1576, 1504, 1447, 1358, 1195, 1129 cm^{-1} (CO)

10 SM (m/z) 555 ($M^+ + 1$), 577 ($M^+ + \text{Na}$).

Dans le but d'étudier la cinétique de coupure du rétinoate d'arbutine par la β glucocérébroside, nous avons synthétisé le produit de son hydrolyse : le p-rétinoate de 4-hydroxyphényle.

15

Préparation du p-rétinoate de phénol



On ajoute 300 mg de Na_2CO_3 (2.8 mmol) séchés à une solution d'hydroquinone (300 mg, 2.7 mmol) dans 20 l'acétone anhydre (15 ml) maintenue sous argon, puis lentement les 15 ml de la solution de chlorure de rétinoyl (max 3 mmol) préparé précédemment. Après 1 heure d'agitation, on hydrolyse le chlorure d'acide en excès en ajoutant 5 ml d'eau et on neutralise le milieu 25 par ajout de quelques gouttes d'une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique extraite, séchée, évaporée sous vide et purifiée par HPLC (C_{18} : éluant $\text{MeOH-H}_2\text{O}$: 90-10) fournit 0.61 g de cristaux rouges (Rdt = 52 %).

30

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm :

6.95 et 6.78 (2d, 4H, H-2', 3', 5', 6', J = 11Hz), 7.07 (dd, 1H, H-11"), 6.1-6.4 (m, 4H, H-7", 8" - CH=CH, 10", 12" -CH=CH), 5.8 (s, 1H, H-14" -CH=CH-), 2.4 (1 s, 3H, H-20" -CH₃), 2-2.1 (1s et m, 5H, H-19" - CH₃, 4" -CH₂), 1.4-1.72 (1m, 1s, 7H, H-2", 3" - (CH₂)₂, 18" -CH₃), 1.02 (1s, 6H, H-16", 17" -CMe₂).

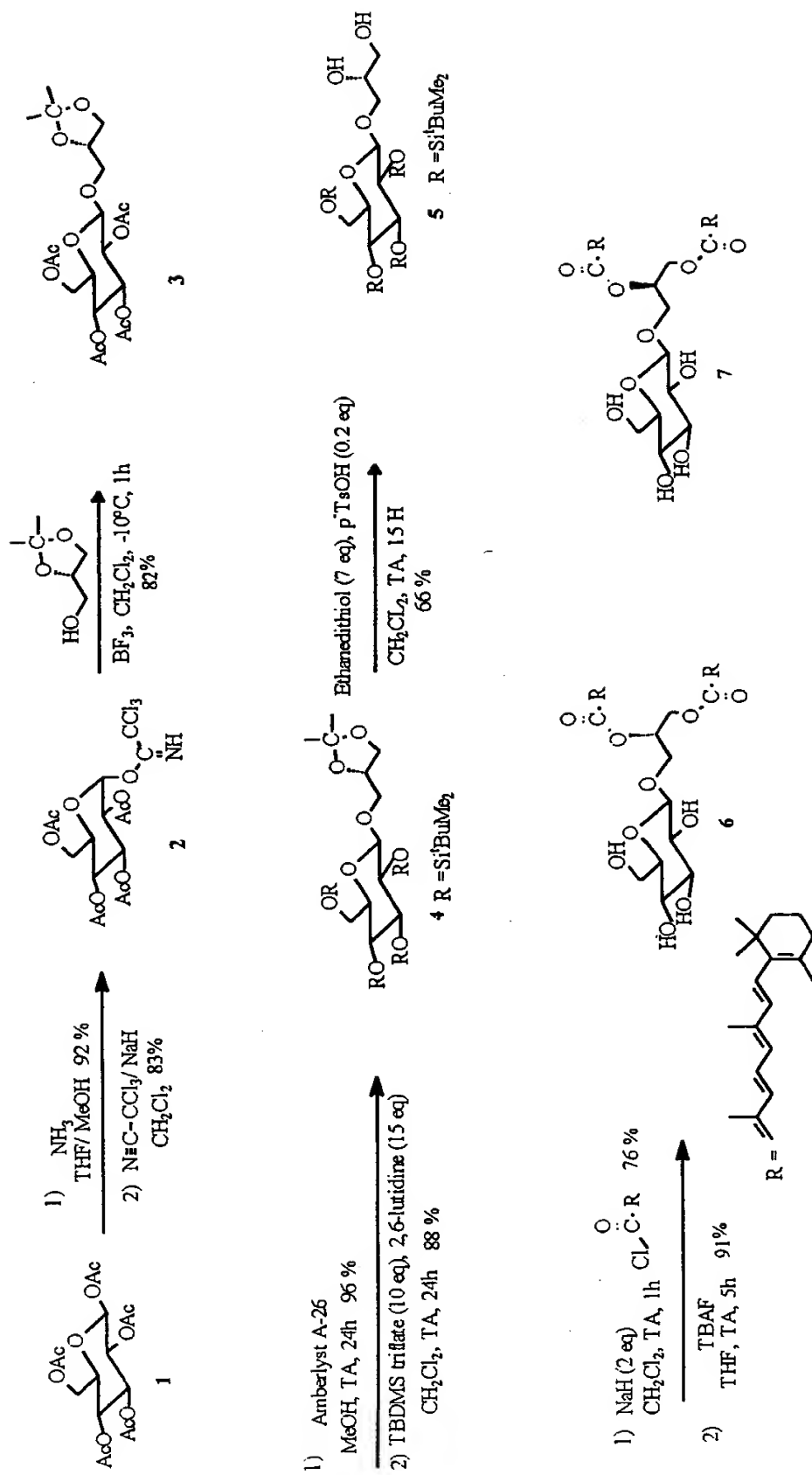
RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm :

166.4 (C-15"), 155.3 (C-13"), 153.8 (C-1'),
 10 143.9 (C-4'), 140.3 (C-9"), 137.7 (C-6"), 137.4 (C-8"),
 135 (C-12"), 131.9 (C-11"), 130.2 (C-5"), 129.5 et
 128.9 (C-10", 7"), 122.8 (C-3', 5'), 117.8 (C-14"),
 117.3 (C-2', 6'), 39.6 (C-2"), 34.3 (C-1"), 33.2 (C-4"),
 29 (C-16", 17"), 21.8 (C-18"), 19.3 (C-3"), 14.2 et 13
 15 (C-20", 19")

SM (FAB/ MNBA) m/Z : 415 (M'+Na).

Synthèse du dérivé dirétinoyl-1,2-propanyl-
 20 glucopyranoside (conjugué glucose-glycérol-acide
 rétinolique)

La figure ci-dessous décrit le schéma réactionnel
 que nous avons emprunté pour réaliser la synthèse des
 composés 6 et 7 (énantiomères en C₂ de l'espaceur
 25 glycérol).



La déacylation sélective en position 1 a été obtenue par aminolyse du glucopyranose peracétylé 1 en mettant en œuvre l'ammoniac dans le mélange (THF-MeOH : 7-3).

Le gluco-conjugué 3 a été préparé selon la
5 méthode de Schmidt (Schmidt, R.R. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1986, 25, 212) qui permet un couplage stéréosélectif en utilisant l'imide comme activateur nucléofuge.

Cet intermédiaire est synthétisé par action de
10 l'hydruure de sodium sur le glucopyranose déprotégé en C-1, qui transformé en alkoxyde, réagit comme nucléophile sur le trichloroacétonitrile pour donner l' α -imide 2.

Le spectre IR de ce composé présente la bande
15 caractéristique à 1670cm^{-1} attribuable à la liaison imine C=N. Le spectre RMN ^1H de ce composé comporte un doublet à 6.6 ppm qui traduit la présence de l'hydrogène en 1 couplé à l'hydrogène sur le carbone C-2, dans une configuration α ($J = 3.5\text{ Hz}$).

20 En présence d'acide de Lewis (BF_3 etherate), l' α -imide tétraacétylé 2 réagit avec un alcool dans le chlorure de méthylène et conduit à la formation du glucoconjugué correspondant. Cette réaction résulte d'une activation initiale de la fonction imide par
25 l'acide de Lewis, suivie d'une attaque nucléophile de l'alcool sur le carbone 1 de la partie osidique pour donner exclusivement le dérivé β -glucosylé ($J=8\text{ Hz}$ en C_1).

La déprotection des glucoconjugués tétraacétylés
30 est obtenue par traitement par résine échangeuse d'ions (amberlyst A-26 (OH)) selon une série d'échanges ioniques à la surface de la résine.

Une filtration rapide après une nuit de contact avec la résine permet d'isoler facilement avec un rendement important le composé hydrosoluble déprotégé.

La silylation des dérivés osidiques par le TBDMS triflate ne conduisant généralement qu'à de très faibles rendements (T. Limori, H. Takashashi and S. Ikegami, Tetrahedron Lett., 1996, 37, 649), nous avons mis au point les conditions d'obtention d'une silylation des 4 fonctions hydroxyle libres du glucopyranose. La structure du dérivé obtenu est établie par le spectres de RMN ^1H : la présence des protons méthyliques des groupes TBDMS et leur intégration établit avec certitude la tétrasilylation.

L'hydrolyse sélective de l'acétal 4 sans le départ concomitant des protections silyl a pu être obtenue avec un rendement de 66 % en utilisant un excès d'éthane-dithiol en présence d'une quantité catalytique d'acide p-toluène-sulfonique dans le chlorure de méthylène. La structure du composé 5 est déduite des spectres IR (bande OH à 3390 cm^{-1} et de masse (FAB $\text{M}^+ \text{Na} = 733$), des spectres de RMN du proton et du ^{13}C qui montrent la disparition des méthyles de l'acétal.

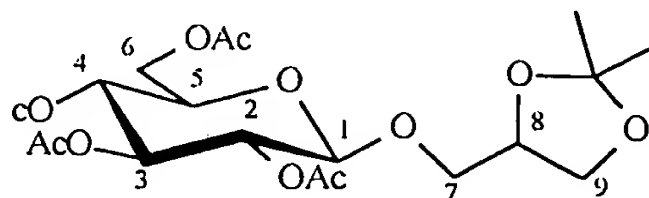
La double estérification est obtenue avec 76 % de rendement, selon la méthode appliquée précédemment. Ainsi, en présence de deux équivalents d'hydrure de sodium, le diol réagit avec le chlorure de rétinoyl pour donner le di-ester attendu. Les caractéristiques spectrales sont conformes à la structure proposée. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C montrent la présence des synthons rétinoyliques et glucose tétrasilylé.

L'étape finale de déprotection des groupes hydroxyle portés par le motif saccharidique a été ensuite pratiquée dans du THF anhydre, en présence de 4

équivalents de TBAF et conduit au conjugué glucose-glycérol-acide rétinoyique 6 avec un rendement de 90 %.

(TBDMS = tert-butyldimethylsilyl ; TBAF = tetra-n-butylammonium fluoride))

5 Préparation du dérivé 3



On ajoute lentement, 100 mg d'éthérate de BF_3 en solution dans 1 ml de CH_2Cl_2 à un mélange refroidi à -10°C de 1.6g d'imidate (4.6 mmol) et de 0.6g d' α,β -isopropylidèneglycérol (4.6 mmol) dans 30 ml de CH_2Cl_2 . On maintien l'agitation pendant 2h, on lave avec NH_4Cl saturé et on neutralise avec une solution saturée de NaHCO_3 . Après séchage (MgSO_4), on concentre sous pression réduite et on purifie le résidu brut par chromatographie flash (éluant : hexane-acétate d'éthyle : 3-2). On obtient 1.74g (3.8 mmol) de cristaux blancs.

RMN ^1H CDCl_3 δ ppm (300 MHz) :

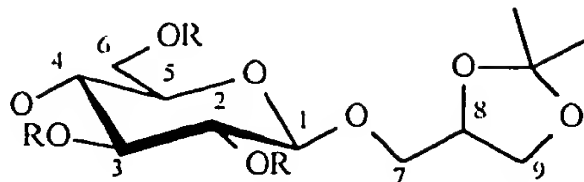
4.36-5.19 (m, 3H, H-1, 2, 3), 4.59(dd, 1H, H-5), 4.23-3.57 (m, 8H, H-4, 8, 2H6, 2H7, 2H9), 1.96-2.07 (4s, 12H, Ac), 1.39 et 1.32 (2s, 6H, CH_3 acétal).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm :

169.3-170.7 (4s, 4 OCOR), 109.4 (C_{quart} , isopropylidène), 101 (C-1), 74.2 (C-8), 72.8 (C-3), 71.9 (C-5), 71.2 (C-2), 69.2 (C-7), 68.4 (C-4), 66.8 (C-9), 61.9 (C-6), 26.6 et 25.4 (2CH_3 des acétals).

IR : 1756 cm^{-1} (ester $\text{C}=\text{O}$), 1370 , 1229 , 1167 , 1050 cm^{-1} (CO)

Préparation du dérivé silylé 4



$\text{R} = \text{Si}^t\text{BuMe}_2$

5

On laisse pendant 24 heures à température ordinaire, une solution de 400 mg (0.86 mmol) du gluco-conjugué 3 dans 20 ml de MeOH contenant 75 mg de résine Amberlyst A26. La solution filtrée et concentrée
10 fournit 250 mg de dérivé glucopyranoside déprotégé (0.85 mmol).

Une solution du dérivé déprotégé précédent (250 mg) contenant 1.1g de lutidine (10 mmol) dans 15 ml de chlorure de méthylène anhydre, refroidi à 0°C et sous
15 argon, est additionnée de 1.8g (6.8 mmol) de TBDMS triflate. Le mélange est maintenu sous agitation à température ordinaire pendant 30 heures. La solution organique lavée, séchée et évaporée sous vide fournit après purification par chromatographie flash, 0.4 g de
20 résine incolore (éluant : Hexane-AcOEt : 30-1).

RMN ^1H CDCl_3 δ ppm (300 MHz) :

4.68 (d, 1H, H-1, $J_{\text{aa}}=10\text{ Hz}$), 4.32 (dd, 1H, H-3),
4.05 (t, 1H, H-8), 3.58-3.89 (m, 9H, H-2, 4, 5, 2H6,
25 2H7, 2H9), 1.35 et 1.41 (2s, 6H, CH_3 acétal), 0.85-0.9
(4s, 36H, 4 Si^tBu), 0.04-0.09 (4s, 24H, SiMe_2).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm :

109 (C_{quat} , isopropylidène), 102.3 (C-1), 82.4 (C-3), 79.1 (C-5), 77.5 (C-2), 74.5 (C-8), 70.2 (C-4), 70.1

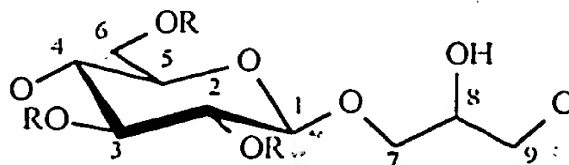
(C-7), 67.6 (C-9), 64.2 (C-6), 26.9 et 25.5
5 (2CH₃ des acétals), 25.9 (CH₃ (^tBu)), 17.9-18.4 (4s, C_{quat}-Si), -4.11-(-5.4) (4s, CH₃Si).

SM (FAB/ ONPOE) m/z : 773 (M'+Na)

IR : 1472, 1361, 1255, 1096 cm⁻¹ (CO)

10

Préparation du dérivé 5



R = Si^tBuMe₂

A une solution de 1g de 4 (1.33 mmol) dans 20 ml de chlorure de méthylène, on ajoute sous argon et sous agitation mécanique 0.88g d'éthane dithiol (9.33 mmol) et 25 mg d'acide p-toluène sulfonique (0.132 mmol). On maintient l'agitation pendant 15 heures encore. Après lavage avec une solution saturée de NaCl, séchage (MgSO₄) puis filtration, on récupère après
20 concentration sous vide un résidu qui est purifié par chromatographie flash (hexane-acétate d'éthyle : 1-1). On recueille ainsi 0.625g d'huile incolore (Rdt = 66 %).

25 RMN ¹H CDCl₃ δ ppm (300 MHz) :

4.67 (d, 1H, H-1, J_{aa}=10 Hz), 3.53-3.96 (m, 13H, H-2, 3, 4, 5, 2H₆, 2H_{1'}, 2H_{2'}, 2H_{3'}, 2 OH), 0.85-0.9 (4s, 36H, 4 Si^tBu), 0.038-0.09 (4s, 24H, SiMe₂).

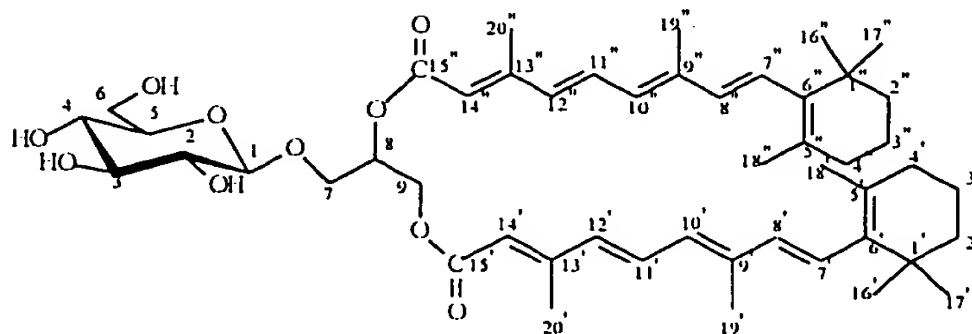
RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm :

103.3 (C-1), 82.7 (C-3), 78.9 (C-5), 78.2 (C-2),
72.2 (C-1'), 71 (C-4), 70.2 (C-2'), 64.2 (C-6), 63.9
(C-3'), 25.9 (CH_3 (^tBu)), 18.4-17.9 (4s, $\text{C}_{\text{quat}}\text{Si}$), -
5 4.11-(-5.4) (4s, CH_3Si).

SM (FAB/ ONPOE) m/z : 733 ($\text{M}^+ + \text{Na}$)

IR : 3390 cm^{-1} (OH), 1384 , 1218 , 1078 cm^{-1} (CO)

10 Préparation du dérivé 6 (S) ou 7 (R)



La double estérification est conduite selon le
mode opératoire décrit pour la synthèse du rétinoate
d'arbutine, mais ici nous prenons le chlorure de
15 méthylène comme solvant et utilisons 2 équivalents
d'hydruure de sodium. La séparation du composé estérifié
qui se trouve dans la zone $R_f=0.2$ élué par le mélange
(Hexane-AcOEt : 25-1) est réalisée par chromatographie
flash.

20 On désilyle le diester obtenu (0.68g, 0.53 mmol)
par 2.3 g de TBAF (7.4 mmol) dans 15 ml de THF anhydre.
Après 4 h d'agitation, lavages de l'extrait et
évaporation à sec, on purifie par CCM sur gel de
silice, type 60, dans un mélange CH_2Cl_2 -MeOH (95-5) R_f
25 = 0,3. On isole 0,4 g de cristaux rouges.

(6, $\alpha_D = -8^\circ$, forme S)

(7, $\alpha_D = +12^\circ$, forme R)

RMN ^1H CDCl_3 δ ppm (300 MHz) :

6.97 (dd, 2H, H-11', 11" C=CH, $JJ = 16\text{Hz}$), 6.08-6.3
 (m, 8H, H-7', 7", 8', 8" -HC=CH, H-10', 10", 12', 12"
 -C=CH), 5.74 (s, 2H, H-14', 14" -CH=CH,), 4.32-
 5 4.37 (m, 2H, H-1, 8), 3.23-3.96 (m, 14H, H-2, 3, 4, 5,
 2H6, 2H7, 2H9), 2.3 (s, 6H, H-20', 20" -CH₃), 1.97-2.03
 (1s et m, 10H, H-19', 19" -CH₃, H-4', 4" -CH₂), 1.36-
 1.68 (1m, 1s, 14H, H-2', 3', 2", 3" -(CH₂)₂, H-18', 18"
 -CH₃), 0.94, 0.98, 1, 1.01, (4s, 12H, H-16', 16", 17',
 10 17" -CMe₂).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm :

167, 166.5 (C-15', 15"), 154.3, 153.8 (C-13',
 13"), 140 (C-9', 9"), 137.7 (C-6', 6"), 137.3 (C-8,
 15 8"), 135.1 (C-12', 12"), 131.6 (C-11', 11"), 130.4 (C-
 5', 5"), 129.6 et 128.8 (C-10', 10", 7', 7"), 117.9 (C-
 14', 14"), 103.7 (C-1), 76.1 (C-8), 73.7 (C-3, 5), 70 (C-
 2, 4), 68.3 (C-7), 62.5 (C-9), 62 (C-6), 39.6 (C-2',
 2"), 34.3 (C-1', 1"), 33.2 (C-4', 4"), 29 (C-16', 16",
 20 17', 17"), 21.8 (C-18', 18"), 19.3 (C-3', 3"), 13.8 et
 13 (C-20', 20", 19', 19")

IR : 3427 cm^{-1} OH, 1706 cm^{-1} (ester C=O), 1609,
 1457, 1384, 1237, 1141, 1083 cm^{-1} (CO)

25 SM (FAB/ MNBA) m/z : 841 ($M^+ + \text{Na}$)

b) Formulations

Les compositions selon l'invention contiennent de
 0,001 à 10 % en poids, de préférence 0,01 % à 0,13 en
 30 poids, de précurseurs d'actifs par rapport au poids
 total de la composition.

La composition selon l'invention peut se
 présenter sous forme d'émulsion huile dans eau (H/E) ou

eau dans huile (E/H). Elle peut encore se présenter sous forme de sphérules comme les liposomes, les nanocapsules ou les nanosphères.

Lorsque la composition est une émulsion, la
5 proportion de la phase grasse va de 5 à 80 % en poids, de préférence de 5 à 50 % en poids, par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnants et les coémulsionnants utilisés dans la composition, sous forme d'émulsion, sont choisis parmi
10 ceux classiquement utilisés en cosmétique. L'émulsionnant et le coémulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0.3 à 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

La composition selon l'invention peut également
15 contenir des additifs cosmétiques ou dermatologiques acceptables. Ces additifs peuvent être, en particulier, des antioxydants, des bioprécurseurs de ces antioxydants comme le δ -tocophérylglycopyranoside, des tensioactifs, des corps gras, des agents hydratants,
20 des conservateurs, des parfums, des gélifiants, des chélateurs, des pigments comme l'oxyde de titane, des filtres et des vitamines libres comme l'acide ascorbique.

25

c) Etude enzymatique

- Comparaison des activités β -glucocérébrosidase et estérase

30 La technique de stripage permet de doser avec une précision très satisfaisante ces deux activités distinctes à partir d'un même prélèvement. Nous avons utilisé, pour cela, deux substrats artificiels, le 4-

méthyl-umbelliferyl- β -D-glucopyranoside (2 mM) pour le dosage de l'activité β -glucocérébroside et le 4-méthyl-umbelliferyl-palmitate (2 mM) pour celui des estérases.

- 5 Le tableau suivant donne la quantité de 4-méthyl-umbelliférone libérée suite à l'hydrolyse en 1 heure par les β -glucocérébroside et estérase extraites de trois stripages de 25 cm².

10 On note qu'à pH cutané (pH = 5.5), l'activité β -glucocérébroside est en moyenne deux fois plus élevée que celle de l'estérase.

	β - glucocérébroside	Estérase
Activités pondérées nmoles/ heure/ μ g de protéines totales	0,23 \pm 0,1	0,13 \pm 0,08

- Reconnaissance et hydrolyse des pseudo-substrats

- 15 Après avoir vérifié que la β -glucocérébroside est exprimée dans les kératinocytes, nous avons produit une enzyme recombinante dans le système baculovirus. Une queue histidine a été rajoutée à l'extrémité COOH de la protéine pour permettre sa purification par
20 chromatographie sur colonne d'affinité.

Ainsi, nous avons pu déterminer les constantes de Michaelis (Km) et les Vm de la β -glucocérébroside recombinante pour notamment le gluco-conjugué acide rétinique arbutine. Les mesures de cinétique sont
25 effectuées dans un tampon phtalate à pH 5.6 (0.025 M)

contenant du taurocholate (5 mM), de la β -glucocérébroside purifiée et le conjugué étudié aux différentes concentrations. L'incubation dure 30 minutes et le dosage de la quantité du conjugué

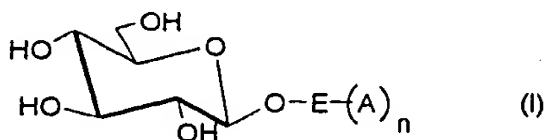
5 hydroquinone-acide rétinolique libéré est réalisé par HPLC. Le tableau ci-dessous donne les résultats obtenus. Ils montrent en termes d'affinité que les deux glucoconjugués étudiés sont bien meilleurs substrats que la référence. En ce qui concerne leur vitesse

10 d'hydrolyse, elle est inférieure et permet donc d'obtenir des effets dans le temps.

Substrats	Km	Vm pondérée par la quantité de protéines solubles.
4-Méthylumbelliféryl-glucopyranoside	$2,8 \pm 0,7 \text{ mM}$	4000 ± 1000 nmoles/ h/ mg
δ -Tocophéryl-glucopyranoside	$7 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$	453 ± 20 nmoles/ h/ mg
Rétinoate d'arbutine	$5 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{M}$	235 ± 19 nmoles/ h/ mg
Dirétinyl-glycéryl-glucopyranoside 7 (R)	$8,6 \pm 2,5 \text{ } \mu\text{M}$	74 ± 7 nmoles/h/mg
Dirétinyl-glycérol-glucopyranoside 7 (S)	$5 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{M}$	$17 \pm 0,4$ nmoles/h/mg

REVENDEICATIONS

1. Complexe glucosylé ternaire, bioprécurseur d'au
moins un principe actif rétinolique, destiné à une
5 application percutanée, de formule (I)



dans laquelle :

- E représente un groupement espaceur hydrocarboné
linéaire, ramifié ou cyclisé, de caractère
10 aliphatique ou aromatique pouvant contenir un ou
plusieurs hétéroatome(s) d'oxygène et pouvant porter
un ou plusieurs groupe(s) carbonyle,
- A représente un reste d'une molécule dudit principe
actif rétinolique, lié au groupement espaceur par une
15 fonction carboxylate,
- $n = 1$ ou 2 .

2. Complexe glucosylé selon la revendication 1,
caractérisé en ce que le principe actif rétinolique
20 est l'acide rétinolique.

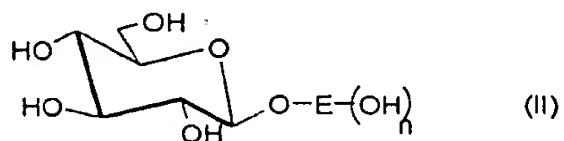
3. Complexe glucosylé selon l'une des revendications 1
à 2, caractérisé en ce que le groupement E
représente un groupement doté d'une activité
25 pharmaceutique et/ou cosmétique complémentaire.

4. Complexe glucosylé selon l'une des revendications 1
à 3, caractérisé en ce que le groupement E est doté
d'une activité d'hydratation, de dépigmentation,
30 et/ou antibactérienne.

5. Complexe glucosylé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le groupement E représente un groupement dérivé du glycérol L ou D, de l'hydroquinone, ou de flavonoïdes, en particulier de flavonoïdes d'origine naturelle.
6. Complexe glucosylé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :
- le para-rétinoyl-phényl-glucopyranoside,
 - 10 - le dirétinoyl-1,2-propanyl-glucopyranoside,
 - le rétinoate de daidzine, et
 - le rétinoate de génistine.
7. Composition pharmaceutique ou cosmétique à usage topique, caractérisée en ce qu'elle contient un complexe glucosylé selon l'une des revendications 1 à 6, associé à un véhicule approprié pour l'administration percutanée.
8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que lorsqu'elle est appliquée sur la peau, ledit complexe subit une double réaction enzymatique, d'abord de type β -glucocérébrosidease conduisant à l'hydrolyse entre le glucose et le groupement espaceur, puis de type estérase conduisant à l'hydrolyse entre le groupement espaceur et le principe actif, ce dernier étant ainsi libéré de façon retardée sans effet d'accumulation dans les différentes couches de la peau.
9. Composition selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,001 à 10%

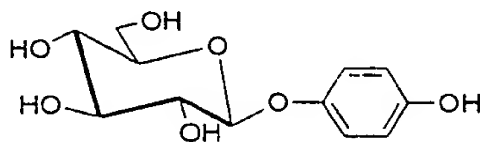
en poids, de préférence 0,01 à 0,1% en poids, de complexe glucosylé par rapport au poids total de la composition.

- 5 10. Composition selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'émulsion.
- 10 11. Composition selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de sphérules, comme les liposomes, les nanocapsules ou les nanosphères.
- 15 12. Procédé de préparation d'un complexe selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on fait réagir un composé de formule (II)

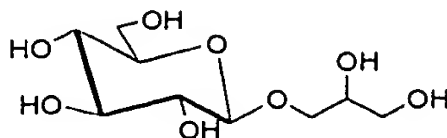


avec le principe actif sous forme de chlorure d'acide.

- 20 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le composé de formule II répond à la formule suivante IIa :



14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le composé de formule II répond à la formule suivante I Ib :



5

15. Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que le chlorure d'acide est le chlorure de rétinoyle.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
 CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 26, Avenue Kléber
 75116 PARIS

THIS PAGE BLANK (USPTO)